

2000-241773

Name of Documents: Patent Application  
Docket Number: 863226  
Date of Filing: August 9, 2000  
To: Director of the Patent Office, Esq.  
IPC: C12Q 1/68

Inventor(s):

Address; c/o Fuji Photo Film Co., Ltd.,  
3-11-46, Senzui, Asaka-shi,  
Saitama, Japan

Name; Yoshihide Iwaki  
Yoshihiko Makino  
Hiroshi Shinoki

Address; 7-31-17, Hibaru, Minami-ku,  
Fukuoka-shi, Fukuoka, Japan

Name; Satoru Kuhara

Address; 40-27, Najima 4-chome, Higashi-ku,  
Fukuoka-shi, Fukuoka, Japan

Name; Kosuke Tashiro

Address; Seriso 8, 16-4, Harada 2-chome,  
Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka,  
Japan

Name; Shigeru Muta

Applicant(s):

Registration Number; 000005201

Name; FUJI PHOTO FILM CO., LTD.

Agent:

Registration Number; 100074675

Patent Attorney

Name; Yasuo Yanagawa

Telephone Number; 03-3358-1798

09/927,697

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 5月29日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-161199

出 願 人

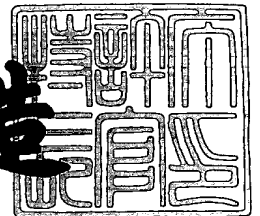
Applicant(s):

富士写真フイルム株式会社

2001年 8月24日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3076186

【書類名】 特許願

【整理番号】 863277

【提出日】 平成13年 5月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 DNA分析用マイクロアレイの製造方法

【請求項の数】 18

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内

    【氏名】 岩木 義英

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内

    【氏名】 牧野 快彦

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内

    【氏名】 篠木 浩

【発明者】

    【住所又は居所】 福岡県福岡市南区桧原 7 - 3 1 - 1 7

    【氏名】 久原 哲

【発明者】

    【住所又は居所】 福岡県福岡市東区名島 4 丁目 4 0 - 2 7

    【氏名】 田代 康介

【発明者】

    【住所又は居所】 福岡県福岡市東区原田 2 丁目 1 6 - 4

    【氏名】 牟田 滋

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

【識別番号】 100074675

【弁理士】

【氏名又は名称】 柳川 泰男

【電話番号】 03-3358-1798

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2000-241773

【出願日】 平成12年 8月 9日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 055435

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9801174

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 DNA分析用マイクロアレイの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表面に反応性基を有する固相担体の上に、該反応性基と反応して共有結合を形成することのできる反応性基を備えた、核酸断片、オリゴヌクレオチドもしくはPNAから選ばれるプローブ分子を含み、かつ増粘剤の添加により所定の粘度にまで増粘された水性液を点着する工程；

該水性液の点着が行なわれた固相担体をインキュベートして、該基板表面にて共有結合反応を生起させる工程；そして、

該基板表面を水性媒体で水洗して、増粘剤を固相担体表面から除去する工程を含む、DNA分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項2】 固相担体に点着される水性液の粘度が $2 \sim 50 \text{ mPa} \cdot \text{S}$ の範囲にある請求項1に記載のDNA分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項3】 増粘剤が水溶性ポリマーである請求項1もしくは2に記載のDNA分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項4】 固相担体表面の反応性基がスルホニルビニル基であり、プローブ分子に備えられた反応性基がアミノ基である請求項1乃至3のうちのいずれかの項に記載のDNA分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項5】 固相担体表面のスルホニルビニル基が、基板表面に予め付設されていたアミノ基にジビニルスルホン誘導体を反応させることにより形成されたスルホニルビニル基である請求項4に記載のDNA分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項6】 固相担体表面を水洗する水性媒体が界面活性剤を含んでいる請求項1乃至5のうちのいずれかの項に記載のDNA分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項7】 固相担体表面の二以上の所定領域に、それぞれが所定の粘度となるように増粘された水性液を点着することを特徴とする請求項1乃至6のうちのいずれかの項に記載のDNA分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項8】 二以上の所定領域に点着される水性液の粘度が互いに等しい

ことを特徴とする請求項 7 に記載の DNA 分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項 9】 請求項 1 乃至 8 のうちのいずれかの項に記載の方法で製造された DNA 分析用マイクロアレイ。

【請求項 10】 表面に荷電性基を有する固相担体の上に、該荷電性基に静電結合することのできる荷電性基を備えた、核酸断片、オリゴヌクレオチドもしくは PNA から選ばれるプローブ分子を含み、かつ増粘剤の添加により所定の粘度にまで増粘された水性液を点着する工程；

該水性液の点着が行なわれた固相担体をインキュベートして、該プローブ分子を該基板表面に静電結合させる工程；そして、

該基板表面を水性媒体で水洗して、増粘剤を固相担体表面から除去する工程を含む DNA 分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項 11】 固相担体に点着される水性液の粘度が  $2 \sim 50 \text{ mPa} \cdot \text{S}$  の範囲にある請求項 10 に記載の DNA 分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項 12】 増粘剤が水溶性ポリマーである請求項 10 もしくは 11 に記載の DNA 分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項 13】 固相担体表面の荷電性基がアミノ基であり、プローブ分子に備えられた荷電性基がリン酸基である請求項 10 乃至 12 のうちのいずれかの項に記載の DNA 分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項 14】 固相担体表面のアミノ基が、基板表面のアミノシランカップリング剤もしくはポリ陽イオンによる処理により導入されたアミノ基である請求項 13 に記載の DNA 分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項 15】 固相担体表面を水洗する水性媒体が界面活性剤を含んでいる請求項 10 乃至 14 のうちのいずれかの項に記載の DNA 分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項 16】 固相担体表面の二以上の所定領域に、それぞれが所定の粘度となるように増粘された水性液を点着することを特徴とする請求項 10 乃至 15 のうちのいずれかの項に記載の DNA 分析用マイクロアレイの製造方法。

【請求項 17】 二以上の所定領域に点着される水性液の粘度が互いに等しいことを特徴とする請求項 16 に記載の DNA 分析用マイクロアレイの製造方法

【請求項 1 8】 請求項 1 0 乃至 1 7 のうちのいずれかの項に記載の方法で製造された DNA 分析用マイクロアレイ。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子の発現、変異、多型などの同時解析に非常に有用な DNA 分析用マイクロアレイの製造方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

多種多様な生物の遺伝子構造を明らかにするのみならず、その遺伝子機能をゲノムスケールで解明しようとする試みが行われつつあり、遺伝子機能を効率的に解析するための技術開発も急速に進んでいる。DNA マイクロアレイ（DNA チップともいう）は、スライドガラス等の固相担体（基板）に多数の DNA 分子を所定の領域毎に整列固定させた高密度のアレイであり、核酸の塩基配列の決定、並びに遺伝子の発現、変異、多型性などの同時解析に非常に有用である。この DNA マイクロアレイを用いた遺伝子情報の解析は、DNA などの生体分子にも適用可能であり、創薬研究、疾病の診断や予防法の開発などに極めて有用であるため、DNA マイクロアレイの作製技術および得られたデータの解析システムのより一層の開発が望まれている。

【0 0 0 3】

DNA マイクロアレイを用いた DNA 等の核酸の検出に際しては、まず固相担体表面に高密度に整列した DNA 断片などのプローブに対して、ラジオアイソトープ（RI）や蛍光で標識した核酸断片試料（ターゲット核酸資料）をハイブリダイズさせる。このとき、ターゲット核酸中の、プローブと相補的な塩基配列をもつ分子は、プローブと相補的に結合（ハイブリダイズ）する。次いで、このハイブリダイズしている標識したターゲット分子のシグナルを測定し、ハイブリダイズされたプローブ分子を同定する。具体的には、RI や蛍光イメージスキャナーでマイクロアレイ上の放射線強度または蛍光強度を測定し、そして得られた画

像データを解析処理する。従って、DNAマイクロアレイによれば、数千乃至数万個の分子を同時にハイブリダイズさせて検出することができ、微量の試料で短時間のうちに大量の遺伝子情報を得ることができる。

【0004】

DNAマイクロアレイを作製するには、固相担体表面で直接オリゴヌクレオチドを合成する方法（「オン・チップ法」という）と、予め調製したDNA断片を固相担体表面に固定する方法などがある。前者のオン・チップ法は、光照射で選択的に除去される保護基を使用し、半導体製造に用いられるフォトリソグラフィ技術と固相合成技術を利用して、固相担体上の多数の微小なマトリックスで、組合せ反応（コンビナトリアル・シンセシス）により、多種類のオリゴヌクレオチドを同時に合成する方法である（Fodor, S.P.A. et al, Science, 251, 767-773 (1991)）。

【0005】

一方、後者の方法は、予め調製したDNA断片試料などのプローブ分子を固相担体表面に点着させることにより共有結合あるいはイオン結合を利用して結合固定する方法であり、プローブ分子の種類や固相担体の種類に応じて下記のように分類することができる。

（１）固定するプローブ分子がcDNA（mRNAを鋳型にして合成した相補的DNA）やPCR産物（cDNAをPCR法によって増幅させたDNA断片）などのDNA断片試料である場合には一般に、これらをDNAマイクロアレイ作製装置に備えられたスポット装置を用いて、ポリ陽イオン（ポリリシン、ポリエチレンイミン等）で表面処理した固相担体表面に点着し、DNA断片試料の荷電を利用して固相担体に静電結合させて固定する（Schena, M. et al, Science, 270, 467-470(1995)）。

【0006】

（２）固定するプローブ分子が合成物（オリゴヌクレオチド）の場合には、予め反応活性基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、これらを表面処理した固相担体表面にスポット装置を用いて点着し、共有結合を介して固定させる（「蛋白質・核酸・酵素」、43、2004-2011(1998)；Lamture, J.B. et al., Nucl. Aci



ds Res., 22, 2121-2125(1994); 及び Guo, Z. et al., Nucl. Acids Res., 22, 5456-5465(1994))。オリゴヌクレオチドに導入する反応活性基としては、アミノ基、アルデヒド基、SH基、ビオチンなどが用いられる。固相担体の表面処理には、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等を有する各種のシランカップリング剤が用いられる。この共有結合による場合には、(1)の静電結合による場合に比べて、プローブを固相担体表面に安定に固定することができる。

【0007】

(3) 固定するプローブ分子がPNAである場合には、上記の(2)のオリゴヌクレオチドの場合と同様に、反応活性基を予め導入して、固相担体表面に共有結合により固定する。

【0008】

なお、本出願人による特願平11-346157号明細書は、固相担体をアミノ基を有するシランカップリング剤等で表面処理した後、ジスルホン化合物を接触させることにより、ビニルスルホン基が導入された固相担体表面を形成し、これにDNA断片を共有結合により固定する方法が記載されている。

【0009】

固相担体表面にプローブ分子を点着固定して多数のスポットを形成するには、ピン先端を担体表面に機械的に接触させるピン方式や、インクジェットプリンタの原理を利用したインクジェット方式などによる各種のスポット装置が用いられている。検出対象の核酸断片試料の検出精度を少しでも高めてDNAマイクロアレイによる解析精度を向上させるためには、いずれの装置を用いた場合であっても、固相担体上に点着形成されたスポットでは、プローブ分子が担体表面にしっかりと固定されるとともに、その形状や大きさができるだけ揃っていて、再現性が良いことが望まれている。

【0010】

なお、米国特許第5837196号明細書には、ニトロセルロースなどの結合剤ポリマー(matrix polymer)の溶液を含む生体分子の溶液を、固相担体表面に接触させて核酸などの生体分子を固定する方法が開示されており、結合剤ポリマーは固定後も担体表面に存在して、生体分子を固定するための接着剤として機能

していると理解される。

【 0 0 1 1 】

また、本出願人による特願 2 0 0 0 - 2 2 1 8 0 号明細書には、DNA 断片と親水性ポリマーを含有する水性液を固相担体表面に点着して、DNA 断片を担体表面に結合させることを特徴とする DNA 断片の固定方法が記載されている。この場合にも、固定後に親水性ポリマーの除去は行われず、親水性ポリマーは担体表面に存在して、DNA 断片と担体との静電結合に係る役割および一般的な接着的役割を果たしている。

【 0 0 1 2 】

本発明者の研究によると、DNA 断片などのプローブ分子の際に親水性ポリマーを用いることにより、プローブ分子の固相担体表面への固定が安定化するが、固相担体表面に残留する親水性ポリマーには、ハイブリダイゼーションの実施に際して、プローブと相補性を持たない DNA 断片試料が付着しやすく、このため DNA 断片試料の検出に誤差をもたらしやすいことが判明した。

【 0 0 1 3 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、DNA マイクロアレイを用いる DNA 断片試料の分析に際して、検出精度が高く、かつ検出誤差の発現が少ない DNA マイクロアレイの製造方法を提供することを目的とする。

【 0 0 1 4 】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、DNA 断片などのプローブ分子として、固相担体表面に予め形成した反応性基と共有反応して結合する反応性基を備えたプローブ分子を選び、そのプローブ分子の水性液に、洗浄による除去が容易な水溶性の増粘剤を添加して水性液を増粘させると、水性液を固相担体表面に点着した時に、スポットが安定化し、その形状や大きさが揃って再現性が良いスポットが形成されることを見出した。そして、さらにプローブ分子の固定後に固相担体表面より洗浄などの方法で増粘剤を除去することによって、ハイブリダイゼーションを介することのない核酸断片試料の固相担体表面への付着を防ぎ、その結果として、測定した蛍光

強度にバックグラウンドノイズが生じるのを防ぐことができることを見出し、本発明に到達した。

【 0 0 1 5 】

また、上記のプローブ分子の水性液への増粘剤の添加効果は、プローブ分子の固相担体表面への固定が、静電結合による場合でも、有効に発現されることも判明した。

【 0 0 1 6 】

従って、本発明は、表面に反応性基を有する固相担体の上に、該反応性基と反応して共有結合を形成することのできる反応性基を備えた、核酸断片、オリゴヌクレオチドもしくは PNA から選ばれるプローブ分子を含み、かつ増粘剤の添加により所定の粘度にまで増粘された水性液を点着する工程；

該水性液の点着が行なわれた固相担体をインキュベートして、該基板表面にて共有結合反応を生起させる工程；そして、

該基板表面を水性媒体で水洗して、増粘剤を固相担体表面から除去する工程を含む DNA 分析用マイクロアレイにある。

【 0 0 1 7 】

本発明はまた、表面に荷電性基を有する固相担体の上に、該荷電性基に静電結合することのできる荷電性基を備えた、核酸断片、オリゴヌクレオチドもしくは PNA から選ばれるプローブ分子を含み、かつ増粘剤の添加により所定の粘度にまで増粘された水性液を点着する工程；

該水性液の点着が行なわれた固相担体をインキュベートして、該プローブ分子を該基板表面に静電結合させる工程；そして、

該基板表面を水性媒体で水洗して、増粘剤を固相担体表面から除去する工程を含む DNA 分析用マイクロアレイの製造方法にもある。

【 0 0 1 8 】

本発明の DNA 分析用マイクロアレイの製造方法の好ましい態様は、以下の通りである。

(1) 固相担体に点着される水性液の粘度が、 $2 \text{ mPa} \cdot \text{S} \sim 50 \text{ mPa} \cdot \text{S}$  の範囲にある。

(2) 増粘剤が水溶性ポリマーである。

【 0 0 1 9 】

(3) 固相担体表面の反応性基がスルホニルビニル基であり、プローブ分子に備えられた反応性基がアミノ基である。

(4) 固相担体表面の反応性基がスルホニルビニル基であって、基板表面に予め付設されていたアミノ基にジビニルスルホン誘導体を反応させることにより形成されたスルホニルビニル基である。

【 0 0 2 0 】

(5) 固相担体表面の荷電性基がアミノ基であり、プローブ分子に備えられた荷電性基がリン酸基である。

(6) 固相担体表面の荷電性基がアミノ基であって、基板表面のアミノシランカップリング剤もしくはポリ陽イオンによる処理により導入されたアミノ基である。

【 0 0 2 1 】

(7) 固相担体表面を水洗する水性媒体が界面活性剤を含んでいる。

(8) 固相担体表面の二以上の所定領域に、それぞれが所定の粘度となるように増粘された水性液を点着する。

(9) 二以上の所定領域に点着される水性液の粘度が互いに等しい。ここで粘度が互いに等しいとは、点着された各水性液のスポットの形状が外観的に互いに相違がない状態をもたらす程度に粘度に相違がないことを意味する。

【 0 0 2 2 】

(10) マイクロアレイのスポットの間の変動係数が6.5%以下である。スポットの変動係数(CV)とは、蛍光強度に基づく変動係数であり、蛍光標識試薬Cy5で標識したDNA断片を、スポット装置(Cartesian TECHNOLOGIES社製)を用いて、固相担体表面に二つ以上のスポットとして点着固定することにより作製したDNAマイクロアレイについて、担体表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したときに得られる、各スポットの蛍光強度の平均値に対する標準偏差(SD)の割合(%)を意味する。

【 0 0 2 3 】

本発明のDNA分析用マイクロアレイは、その表面の多数の所定の領域のそれぞれに、蛍光物質で標識した核酸断片試料を溶解あるいは分散してなる水性液を点着した後、これをインキュベートし、そしてマイクロアレイの各点着領域における蛍光強度を測定して、マイクロアレイ上のプローブと核酸断片試料とで形成されたハイブリッドを検出することを特徴とする、マイクロアレイ上のプローブに対して相補性を有する核酸断片の検出方法に利用することができる。

【0024】

【発明の実施の形態】

以下に、DNA分析用マイクロアレイの作製工程と核酸断片試料の検出工程とからなるDNA分析用マイクロアレイ技術の全体像を、図面を参照しながら説明する。

【0025】

本発明に従うDNAマイクロアレイの代表的な作製工程および核酸断片試料の検出工程を、図1に、プローブ分子を固相担体上に共有結合で固定する方法を例にとって、それぞれの作業の流れに従って模式的に示す。なお、この模式図は、「タンパク質・核酸・酵素」(Vol.43, No.13, 2007(1998))から転写したものである。

【0026】

まず、ゲノム、cDNA、EST(ESTは、3'末端から200~300bp(bp:塩基対)程度のcDNA断片を意味する)などの配列が登録されているデータベース(11)、あるいはクローンコレクション(12)から、PCR法による増幅あるいは化学合成により、DNAコレクション(cDNA、EST、オリゴDNA等)(21)を調製する。そして、DNAコレクション(21)を水性液に、増粘剤とともに分散、溶解させ、その増粘させたDNA水性液を、固相担体(31a)の表面に、スポット装置により点着し、次いで増粘剤を水洗除去して、DNA断片(31b)が固定されたDNA分析用マイクロアレイ(31)を得る。

【0027】

一方、細胞や組織などの検体(41)からmRNA又はゲノムDNA(51)

を抽出し、逆転写反応により cDNA 又はターゲット DNA (52) を得る。これを蛍光標識物質 (53a) により標識して、標識したターゲット核酸 (53) とする。ターゲット核酸 (53) は、DNA および RNA のいずれであってもよい。次いで、DNA 分析用マイクロアレイ (31) 上の DNA 断片 (31b) とターゲット核酸 (53) とのハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションによって二本鎖が形成された DNA 分析用マイクロアレイ (61) について、蛍光スキャニング装置を使ってその蛍光強度を測定し、画像データ (71) を得る。得られたデータから、ターゲット核酸の塩基配列を決定したり、遺伝子発現プロファイルを作成することができる。更に、データ解析ソフトや外部データベースを利用することにより、遺伝子の変異や多型などの複雑な解析を行うことも可能である。

## 【 0 0 2 8 】

図 2 に、ハイブリダイゼーション後の DNA 分析用マイクロアレイを拡大して示す。

## 【 0 0 2 9 】

次に、本発明の DNA 断片などのプローブ分子の固相担体への固定方法について、先ず、共有結合による固定を例にとりて、詳細に説明する。

固相担体は、疎水性、あるいは親水性に乏しい担体であることが好ましい。また、その表面が凹凸を有する平面性の低いものであってもよい。固相担体の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス；ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノール A のポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー；シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、織編物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルターなどの多孔質物質、そして金電極などの金属材料表面を挙げることができる。多孔質物質の細孔の大きさは、一般に 2 ～ 1 0 0 0 nm の範囲にあり、好ましくは 2 ～ 5 0 0 nm の範囲にある。表面処理の容易さや蛍光スキャニング装置による測定の容易さから、固相担体の材質は、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。固相担体の厚さは、一般に 1 0 0 ～ 2 0 0 0  $\mu$ m の範囲にある。

## 【0030】

固相担体は、その表面がポリ陽イオン（例えば、ポリーLーリシン、ポリエチレンイミン、ポリアルキルアミン）で被覆処理されて、反応性基が導入されていることが好ましく、特に好ましいのはポリーLーリシンによる被覆処理である。あるいは、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基、メルカプト基等を有するシランカップリング剤によって接触処理されていてもよい。好ましくは、アミノ基またはメルカプト基を有するシランカップリング剤である。ポリ陽イオンによる場合には、アミノ基またはメルカプト基が静電結合によって担体表面に導入されるのに対して、シランカップリング剤による場合には共有結合によって導入されるため、アミノ基またはメルカプト基は担体表面に安定に存在する。

## 【0031】

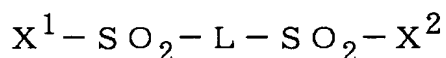
ポリ陽イオンを用いる処理に、シランカップリング剤による処理を組み合わせてもよい。疎水性、あるいは親水性の低い固相担体とDNA断片などのプローブ分子との静電的相互作用を促進することができる。ポリ陽イオン処理がされた固相担体表面上に、さらに、電荷を有する親水性高分子等からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような層を設けることによって、ポリ陽イオン処理がされた固相担体の凹凸を軽減することができる。固相担体の種類によっては、その担体中に親水性高分子等を含有させることも可能であり、このような処理を施した固相担体も好ましく用いることができる。

## 【0032】

DNA断片を共有結合により固定する場合、上記の活性基が導入された固相担体表面に、更に下記に示すようなジスルホン化合物を接触させることにより、ビニルスルホン基が導入された固相担体であることが特に好ましい。このような固相担体およびDNA断片の固定方法については、前記の特願平11-22180号明細書を参照することができる。

## 【0033】

## 【化1】



（ただし、 $X^1$ と $X^2$ は、ビニル基を表わし、Lは二価の連結基を表わす）

## 【0034】

プローブ分子は、目的によって、核酸断片、オリゴヌクレオチドもしくはPNAの三通りに分けることができる。遺伝子の発現を調べるためには、一般に、cDNA、cDNAの一部、EST等のDNA断片（ポリヌクレオチド）を使用する。これらのポリヌクレオチドは、配列や機能が未知であってもよいが、一般的にはデータベースに登録された配列を基にして、cDNAやゲノムのライブラリー、あるいは全ゲノムをテンプレートとしてPCR法によって増幅して調製する（以下、「PCR産物」という）。PCR法によって増幅していないものも使用することができる。

## 【0035】

一方、遺伝子の変異や多型を調べるためには一般に、標準となる既知の配列を基にして変異や多型に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成して使用することもできる。さらに、塩基配列決定の場合には、 $4^n$ （ $n$ は、塩基の長さ）種のオリゴヌクレオチド（オリゴDNA）を合成して使用する。使用するDNA断片の塩基配列は既知であることが好ましい。DNA断片は、オリゴDNAであれば2～50merであることが好ましく、特に好ましくは10～25merである。

## 【0036】

また、プローブ分子として、DNAのホスホジエステル結合をペプチド結合に変換した人工核酸、すなわちペプチド核酸（PNA）を用いることもできる。

## 【0037】

DNA断片などのプローブ材料の一方の末端には、一般に、アミノ基、イミノ基、ヒドラジノ基、カルバモイル基、ヒドラジノカルボニル基、もしくはカルボキシイミド基等の官能基を導入する。好ましくはアミノ基を導入する。共有結合によりDNA断片を固定する場合に、DNA断片の官能基とリン酸エステル基との間にクロスリンカーを存在させることが好ましく、クロスリンカーはアルキレン基またはN-アルキルアミノ-アルキレン基であることが好ましく、より好ましくはヘキシレン基またはN-メチルアミノ-ヘキシレン基であり、特に好ましくはヘキシレン基である。

## 【0038】



前述のように、本発明におけるプローブ分子の固相担体表面への固定は、共有結合のみならず、静電結合によるものであってもよい。プローブ分子の固相担体表面への静電結合による固定は、以前から知られている。例えば、ガラス表面のアミノシランカップリング剤による処理、あるいはポリ陽イオン（例、ポリリシン、ポリエチレンイミン）による被覆処理により、固相担体表面にカチオン性基（アミノ基）を導入し、これに、リン酸基などのアニオン性基を備えたDNA断片、あるいは任意のアニオン性基が導入された合成オリゴヌクレオチドやPNAを接触させる方法が利用される。

## 【0039】

本発明の特徴的な要件である水溶性増粘剤としては、例えば合成もしくは天然の水溶性高分子物質；グリセロールなどの多価アルコール；トレハロース、アルギン酸ナトリウム、でんぷんなどの糖類を挙げることができる。

## 【0040】

水溶性高分子物質としては、カチオン性、アニオン性もしくは両性の親水性ポリマーであることが好ましい。ノニオン性ポリマーも用いることができる。特に好ましいのはカチオン性ポリマーである。ポリマーの分子量は一般に、 $10^3 \sim 10^6$ の範囲にあることが好ましい。分子量がこの範囲を超えると、粘性が大きくなりすぎるため、DNA断片などのプローブ分子の分散性や固相担体への結合に悪影響を及ぼす。

## 【0041】

カチオン性ポリマーは、四級アミン系ポリマーであることが好ましい。具体的には、ポリ（1，4-ジアゾニアビスクロ〔2，2，2〕オクタン-1，4-ジイルメチレン-1，4-フェニレンメチレンクロリド）、ポリビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロリド、ポリアクリル酸メチレントリメチルアンモニウムクロリドエステル、ポリアクリル酸エチレントリメチルアンモニウムクロリドエステル等を挙げることができる。ポリ-N-ビニルピロリドン、ポリビニルイミダゾール、ポリビニルピラゾール等の三級アミン系ポリマーを用いることも好ましい。特に好ましくは、ポリ（1，4-ジアゾニアビスクロ〔2，2，2〕オクタン-1，4-ジイルメチレン-1，4-フェニレンメチレンクロリド）であ

る。

【 0 0 4 2 】

アニオン性ポリマーは、 $\text{COO}^-$ 、 $\text{SO}_3^-$ 、 $\text{OSO}_3^-$ 、 $\text{PO}_3^-$ 、 $\text{PO}_2^-$ 等のアニオン含有ポリマーであることが好ましい。具体的には、カルボキシメチルセルロース、セルロースの硫酸エステル、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリビニルベンゼンスルホン酸、またはこれらの塩を挙げることができる。特に好ましくは、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルベンゼンスルホン酸ナトリウム、およびカルボキシメチルセルロースである。

【 0 0 4 3 】

ノニオン性ポリマーとしては、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルコールのアセタール体、セルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等のセルロース誘導体を挙げることができる。特に好ましくは、ポリアクリルアミドおよびポリエチレングリコールである。

【 0 0 4 4 】

両性ポリマーとしては、アルブミン、ゼラチン、ゼラチン誘導体、アルブミンそしてカゼイン等のタンパク質を挙げることができる。特に好ましいのはアルブミンである。

【 0 0 4 5 】

上記のプロープ分子および水溶性増粘剤を、蒸留水、SSC（標準食塩－クエン酸緩衝液）などの水性媒体に溶解もしくは分散して、DNA断片の水性液を調製する。水性液の粘度は、使用するスポット装置によっても異なるが、一般には  $1 \sim 100 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  の範囲にある。例えば、クイルピンタイプのスポット装置であれば、水性液の粘度は  $2 \sim 50 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  の範囲にあることが好ましく、特に好ましくは  $2 \sim 20 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  の範囲にある。水溶性増粘剤が水溶性高分子物質である場合には、一般に  $0.1 \sim 5$  重量%の範囲で添加され、好ましくは  $0.3 \sim 3$  重量%の範囲にある。増粘剤が多価アルコールや糖類である場合には、一般に  $5 \sim 50$  重量%の範囲で添加され、好ましくは  $10 \sim 40$  重量%の範囲にある。

## 【 0 0 4 6 】

このプローブ分子の水性液を、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注し、分注した水性液をスポット装置等を用いて固相担体上に滴下して点着を行う。スポット装置としては通常は、ピンにプローブ分子水性液を保持させ、そのピンを固相担体表面に接触させ、そして水性液を担体表面に移行させてスポットを形成するピン方式による装置が用いられる。ピンの先端の形状には、ソリッドピンタイプ（特に、溝が切られていないもの）、クイルピンタイプ（万年筆のように溝が切られているもの）など様々なタイプがあり、いずれであっても使用することができる。好ましくは、クイルピンタイプである。また、ピン方式以外にも、インクジェットプリンタの原理を利用したインクジェット方式や、毛細管によるキャピラリ方式などを利用したスポット装置も用いることができる。

## 【 0 0 4 7 】

点着するプローブ分子は、固相担体表面に対して $10^2 \sim 10^5$ 種類/ $\text{cm}^2$ の範囲にあることが好ましい。プローブ分子の量は、 $1 \sim 10^{-15}$ モルの範囲にあり、重量としては数ng以下であることが好ましい。点着によって、プローブ分子は、固相担体表面にスポットとして固定される。本発明においては、プローブ分子の水溶液に水溶性増粘剤が添加されているので、各スポットの形状はほぼ円形であって、ほぼ同じ大きさである。形状や大きさに変動がないことは、遺伝子発現の定量的解析や一塩基変異を解析するために重要である。スポット当たりの水性液の点着量は、一般に $100 \text{ pL} \sim 1 \mu\text{L}$ の範囲にあり、好ましくは $1 \sim 100 \text{ nL}$ の範囲にある。スポットの大きさは、一般には直径が $50 \sim 300 \mu\text{m}$ の範囲にある。そして、スポット間の距離は、一般に $0 \sim 1.5 \text{ mm}$ の範囲にあり、好ましくは $100 \sim 300 \mu\text{m}$ の範囲にある。

## 【 0 0 4 8 】

プローブ分子水溶液の点着後、固相担体上の点着水溶液の急速な乾燥を防ぐために、固相担体を70%以上の湿度及び $25^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ の温度範囲の環境下に置いてもよい。また、プローブ分子と固相担体との結合（固定）をより安定にするために、加熱、紫外線、水素化ホウ素ナトリウムまたはシッフ試薬による後処理を施してもよい。これらの後処理は、複数の種類を組み合わせてもよく、

加熱処理と紫外線処理を組み合わせで行うことが好ましい。あるいは、インキュベーションを行ってもよい。これらの後処理により、プローブ分子と固相担体との間に安定な共有結合あるいは静電結合が形成される。

## 【 0 0 4 9 】

次いで、プローブ分子が結合固定された固相担体の表面を洗浄して、水溶性増粘剤を実質的に除去する。固相担体表面の洗浄は、例えばドデシル硫酸ナトリウム（SDS）水溶液や標準食塩－クエン酸緩衝液を用いて行なうことができる。その際に洗浄液を加温してもよい。これにより、水溶性増粘剤が実質的に取り除かれると同時に、結合しなかったプローブ分子も除去される。

## 【 0 0 5 0 】

上記のプローブ分子の固定方法により作製された本発明のDNA分析用マイクロアレイは、多数のプローブ分子が共有結合もしくは静電結合により固定された領域からなるスポットを多数個（通常は、数百から数万個）有する。スポット間のばらつきの指標となる変動係数はCVが6.5%以下のものであることが好ましい。

## 【 0 0 5 1 】

上記のプローブ分子の固定方法に従って作製されたDNA分析用マイクロアレイの寿命は通常、cDNAが固定されてなるcDNA分析用マイクロアレイでは数週間、オリゴDNAが固定されてなるオリゴDNA分析用マイクロアレイでは更に長期間である。これらのDNA分析用マイクロアレイは、遺伝子発現のモニタリング、塩基配列の決定、変異解析、多型解析等に利用される。

## 【 0 0 5 2 】

次に、本発明のDNA分析用マイクロアレイを用いたDNA断片試料の検出方法について説明する。

まず、標識したDNA断片試料を用意する。DNA断片試料（ターゲットDNA）としては通常、その配列や機能が未知であるDNA断片あるいはRNA断片が用いられる。

## 【 0 0 5 3 】

標識したDNA断片試料は、遺伝子発現を調べる目的では一般に、真核生物で

あればその細胞や組織サンプルから mRNA を抽出した後、逆転写反応により、標識 d N T P (「d N T P」は、塩基がアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) もしくはチミン (T) であるデオキシリボヌクレオチドを意味する) を取り込ませながら、c D N A とすることにより得られる。細菌などの原核生物であれば、m R N A の選択的な抽出が困難であるので全 R N A を抽出する。ゲノムを試料とする場合には、赤血球を除く任意の組織サンプルから単離することができる。赤血球を除く任意の組織は、例えば抹消血液リンパ球、皮膚、毛髪、精液等である。1 回のハイブリダイゼーションに必要な m R N A 量は、液量や標識方法によっても異なるが、通常は数  $\mu$  g 以下である。なお、m R N A をアンチセンス R N A として用いる方法もある。標識 d N T P としては、化学的な安定性の点から、標識 d C T P を用いることが好ましい。また、D N A 分析用マイクロアレイ上の D N A 断片がオリゴ D N A である場合には、D N A 断片試料を低分子化しておくことが望ましい。

## 【 0 0 5 4 】

標識した D N A 断片試料は、遺伝子の変異や多型を調べる目的では、一般に標識プライマーもしくは標識 d N T P を含む反応系でターゲット領域の P C R を行うことにより得られる。

## 【 0 0 5 5 】

標識方法としては、R I 法と非 R I 法 (蛍光法、ビオチン法、化学発光法等) が知られているが、蛍光法を用いることが好ましい。蛍光物質としては、核酸の塩基部分と結合できるものであればいずれであっても用いることができるが、シアニン色素 (例えば、C y D y e<sup>TM</sup> シリーズの C y 3、C y 5 等)、ローダミン 6 G 試薬、N-アセトキシ-N<sup>2</sup>-アセチルアミノフルオレン (A A F)、および A A I F (A A F のヨウ素誘導体) 等を使用することが好ましい。

## 【 0 0 5 6 】

次いで、上記の標識した D N A 断片試料を S S C などの水性媒体に溶解あるいは分散して、試料の水性液を調製する。この水性液を本発明の D N A 分析用マイクロアレイ上に点着した後、インキュベートして、ハイブリダイゼーションを行う。点着は、9 6 穴もしくは 3 8 4 穴プラスチックプレートに試料の水性液を分

注し、スポット装置を用いて滴下することにより実施する。水性液の点着量は、スポット当たり1～100 nLの範囲にあることが好ましい。インキュベーションは、室温～70℃の範囲の温度で、6～20時間の範囲の時間で実施することが好ましい。

## 【0057】

DNA分析用マイクロアレイを使用する場合、使用するDNA断片試料の量が非常に少なくて済む半面、ハイブリダイゼーションに際してはDNA分析用マイクロアレイ上のプローブの鎖長や試料の種類に応じて、その最適条件を設定する必要がある。遺伝子発現の解析には、低発現の遺伝子をも十分に検出できるように、ハイブリダイゼーションを長時間かけて行うことが好ましい。一方、一塩基変異の検出には、ハイブリダイゼーションを短時間で行うことが好ましい。これにより、DNA分析用マイクロアレイ上のDNA断片と、標識したDNA断片試料中の、該プローブと相補的な塩基配列をもつ分子とがハイブリダイズして、ハイブリッドDNA（2本鎖）を形成する。

## 【0058】

ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤の溶液と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応のDNA断片試料を除去することが好ましい。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、あるいはグッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが好ましい。

## 【0059】

次に、DNA分析用マイクロアレイ上のハイブリッドDNAからの蛍光シグナルを検出器により検出する。検出器としては、例えば蛍光レーザー顕微鏡、冷却CCDカメラおよびコンピュータを連結した蛍光スキャニング装置が用いられ、DNA分析用マイクロアレイ上の蛍光強度を自動的に測定することができる。CCDカメラの代わりに共焦点型または非焦点型のレーザーを用いてもよい。これにより、DNA分析用マイクロアレイに対応した画像データが得られる。得られたデータから、DNA分析用マイクロアレイ上のDNA断片などのプローブに対

して相補性を有する試料DNA断片を同定することができ、これに基づいて遺伝子発現プロファイルを作成したり、核酸断片試料の塩基配列を決定することができる。さらに、データ解析ソフトや外部データベースを利用することにより、遺伝子の変異や多型などのより複雑な解析を行うことも可能である。あるいは、試料として互いに異なる蛍光物質によって標識したDNA断片試料を複数種類用意し、これらを同時に用いることにより、一個のDNA分析用マイクロアレイ上で発現量の比較や定量を行うことも可能である。

【0060】

#### 【実施例】

【実施例1～3】共有結合によるDNA断片（プローブ分子）の固定、スポット再現性およびDNA断片固定量の評価

##### （1）共有結合タイプの固相担体（B）の作製

2重量%アミノプロピルエトキシシラン（信越化学工業(株)製）の水溶液に、スライドガラス（25mm×75mm）を10分間浸した後取り出し、水で洗浄後、110℃で10分間乾燥して、アミノシラン化合物で被覆されたイオン結合タイプの固相担体（A）を作製した。次いで、このアミノシラン化合物被覆固相担体（A）を、3重量%1, 2-ビス（ビニルスルホン）アセトアミドエタンのホウ酸緩衝液（pH 8.0）溶液に2時間浸した後、取り出し、水で洗浄し、1時間減圧下で乾燥し、ビニルスルホン基が導入された共有結合タイプの固相担体（B）を得た。

【0061】

##### （2）DNA断片の固定

DNA断片として、3'末端および5'末端がそれぞれアミノ基、蛍光標識試薬（FluoroLink Cy5-dCTP、アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）で修飾された40merのオリゴDNA（5'-CTAGTCTGTGAAGTGTCTGATCCTCCCCGGACATGGAGGA-3'）（（Cy5）オリゴDNA（+））を用意した。別に、下記表1に示すように水溶性増粘剤を溶解した各種の水溶液を調製し、これらの水溶液にDNA断片を $1 \times 10^{-6}$ Mの濃度で分散して、DNA断片の水性液を調製した。これらのDNA断片の水性液を、

DNAマイクロアレイ作製装置（クイルピンタイプ、Cartesian TECHNOLOGIES社製DNAスポット装置）を用い、上記の共有結合タイプの固相担体（B）上に、繰り返し50回点着してスポットを形成した。点着後、固相担体を温度25℃、湿度70%のモイスターチャンバー内において18時間放置してDNA断片を固相担体表面に結合固定した後、チャンバーから取り出し、室温で乾燥した。

## 【0062】

## （3）固相担体の洗浄

これらの固相担体を、室温の0.1重量% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）水溶液と2×SSC（標準食塩－クエン酸緩衝液）との混合溶液で2回、50℃の0.2×SSCで1回、室温の蒸留水で1回順次洗浄して、水溶性増粘剤を除去した。洗浄後、固相担体を室温で乾燥して、DNA断片が固定された固相担体を得た。

## 【0063】

## （4）スポット再現性およびDNA断片固定量の評価

洗浄前後のDNA断片が固定された各固相担体について、スポット部分の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定した。各スポットの蛍光強度（相対値）の平均値（N=50）に対する標準偏差（SD）の割合（%）、すなわちスポットの蛍光強度の変動係数CV（%）を求め、これによりスポット再現性の評価を行った。また、洗浄前後での各スポットの蛍光強度（相対値）の平均値をそれぞれ算出し、その変化率を求めてDNA残存量（%）とし、これによりDNA断片の固定量を評価した。

## 【0064】

## 〔比較例1、2〕

実施例1において、水溶性増粘剤を溶解した水溶液の代わりに、2×SSCおよび蒸留水それぞれを用いてDNA断片の分散した水性液を調製したこと以外は実施例1と同様にして、DNA断片（プローブ）が固定された固相担体を作製した。次いで、実施例1と同様にして、スポット再現性およびDNA断片固定量の評価を行った。

得られた結果をまとめて表1に示す。



【0065】

【表1】

表 1

増粘剤溶液	粘度 (mPa・s)	洗浄工程前		洗浄工程後	
		蛍光強度	CV(%)	蛍光強度	CV(%) 残存率(%)
実施例 1 1 重量%カルボキシメチル セルロース水溶液	8.5	43200	1.8	33100	2.0 76.6
実施例 2 1 重量%ポリアクリル アミド水溶液	12.0	45800	1.6	36300	1.9 79.3
実施例 3 30 重量%トレハロース 水溶液	3.5	41000	2.2	30800	2.5 75.1
比較例 1 2×SSC	1.1	38500	6.5	28200	7.0 73.2
比較例 2 蒸留水	0.9	38000	7.3	28300	7.5 74.5

## 【 0 0 6 6 】

表 1 に示した結果から明らかなように、本発明の方法に従って水溶性高分子物質や糖類を含有する DNA 断片の水性液を用いて作製した DNA 断片固定固相担体（実施例 1 ～ 3）は、従来の方法に従って作製した DNA 断片固定固相担体（比較例 1、2）に比べて、洗浄工程前においてスポットの蛍光強度の CV が  $1/2 \sim 1/3$  に著しく減少した。これにより、本発明の方法では、点着が安定に行われ、スポット形状が円形に揃っていて良好であり、スポットの再現性が高いことが分る。そして、洗浄工程後におけるスポットの CV も、殆ど変化（悪化）せず、再現性の高いスポットを形成保持することができる。一方、従来の方法では、目視でもスポットの形状が丸くなく、不定形のスポットが存在することが確認され、それがスポットの CV を大きくしている一因となっている。

## 【 0 0 6 7 】

また、本発明の方法で製造した DNA 断片固定固相担体の DNA 固定量はいずれも、洗浄工程後も、従来の方法に係る固相担体と同程度に多いことが明らかである。このことから、増粘剤である水溶性高分子物質や糖類はいずれも、DNA 断片の固相担体への固定には実質的に関与していないことが分る。

## 【 0 0 6 8 】

〔実施例 4 ～ 6〕イオン結合による DNA 断片の固定、スポット再現性および DNA 断片固定量の評価

実施例 1 において、共有結合タイプの固相担体（B）の代わりにイオン結合タイプの固相担体（A）を用いたこと、DNA 断片としてオリゴ DNA（+）の代わりに、同じ塩基配列で 5' 末端のみが Cy 5 で修飾された 40mer の（Cy 5）オリゴ DNA（-）を用意したこと、および点着後、固相担体を温度 25℃、湿度 70% のモイスチャーチャンバー内で 18 時間放置する代わりに、温度 80℃ で 1 時間加熱処理した後、担体表面に 120 mV で紫外線（UV）照射を行ったこと以外は実施例 1 と同様にして、DNA 断片が静電結合により固定された固相担体を作製し、次いでスポット再現性および DNA 断片固定量の評価を行った。

## 【 0 0 6 9 】

〔比較例 3、4〕

実施例 4 において、水溶性増粘剤を溶解した水溶液の代わりに、 $2 \times \text{SSC}$  および蒸留水それぞれを用いて DNA 断片の分散した水性液を調製したこと以外は実施例 4 と同様にして、DNA 断片が固定された固相担体を作製し、次いでスポット再現性および DNA 断片固定量の評価を行った。

得られた結果をまとめて表 2 に示す。

【 0 0 7 0 】

【表 2】

表 2

増粘剤溶液	粘度 (mPa・s)	洗浄工程前		洗浄工程後	
		蛍光強度	CV(%)	蛍光強度	CV(%) 残存率(%)
実施例 4 1 重量%カルボキシメチル セルロース水溶液	8.5	48200	1.5	9900	2.9 20.5
実施例 5 1 重量%ポリアクリル アミド水溶液	12.0	50500	1.8	11900	3.1 23.6
実施例 6 30 重量%トレハロース 水溶液	3.5	45200	2.5	2800	6.2 6.2
比較例 3 2×SSC	1.1	42000	7.4	2600	9.9 6.2
比較例 4 蒸留水	0.9	43500	6.8	2400	10.5 5.5

【0071】

表 2 に示した結果から明らかなように、DNA 断片を固相担体表面にイオン結合（静電結合）を介して固定する際に、水溶性高分子物質や糖類などの増粘剤を含有する DNA 断片の水性液を用いて作製した DNA 断片固定固相担体（実施例 4～6）は、従来の方法に従って作製した DNA 断片固定固相担体（比較例 3、4）に比較すると、洗浄工程前においてスポットの蛍光強度の CV が  $1/2 \sim 1/3$  に著しく減少している。これにより、本発明の方法では、点着が安定に行われ、スポット形状が円形に揃っていて良好であり、スポットの再現性が高いことが分る。なお、イオン結合は固相担体表面への結合力が弱いため、その結合を補助していた増粘剤を水洗除去すると、同時に DNA 断片の脱落も発生する。しかしながら、その増粘剤の水洗除去後であっても、残存する DNA 断片は、増粘剤を用いなかった場合（比較例 3、4）よりも多く、特に洗浄工程後のスポットの蛍光強度の CV が共有結合と同じレベルまで低くなっていることから、点着が安定に行われ、スポット形状が円形に揃っていて、スポットの再現性が高いことが分る。

#### 【 0 0 7 2 】

[実施例 7～9] DNA 分析用マイクロアレイの作製および核酸断片試料の検出

##### （1）共有結合による DNA 断片の固定

DNA 断片として、5' 末端がアミノ基で修飾された 40mer のオリゴ DNA (5' - TCCTCCATGTCCGGGGAGGATCTGACACTTCAAGGTCTAG - 3' ) (オリゴ DNA (+))、および 5' 末端がアミノ基で修飾された 500bp の cDNA (cDNA (+)) を用意した。別に、下記表 3 に示すように水溶性増粘剤を溶解した各種の水溶液を調製し、これらの水溶液に DNA 断片を  $1 \times 10^{-6}$  M の濃度で分散して、DNA 断片の水性液を調製した。これらの DNA 断片の水性液を、DNA 分析用マイクロアレイ作製装置を用いて、実施例 1 で作製した共有結合タイプの固相担体 (B) 上に、繰り返し 50 回点着して、スポットを形成した。また、ネガティブコントロールとして、DNA 断片が分散していない水溶性増粘剤のみの水溶液を同様にして固相担体の表面に点着した。点着後、固相担体を温度 25℃、湿度 70% のモイスチャーチャンバー内において 18 時間放置した。さらに、固相担体を 0.5M グリシン水溶液 (pH

8. 5) 中に1時間浸して、DNA断片を固相担体表面に結合固定した。

【0073】

## (2) 固相担体の洗浄

これらの固相担体を沸騰水に3分間浸漬して、水溶性増粘剤を除去した。その後直ちに、固相担体を氷冷したエタノールに浸漬し、室温で乾燥して、DNA断片が固定された固相担体（DNA分析用マイクロアレイ、B'）を得た。

【0074】

## (3) ハイブリダイゼーション

核酸断片試料として、上記のオリゴDNA（オリゴDNA(+)）に対して相補的な塩基配列を部分的に有し、かつcDNA（cDNA(+)）と相補的であって5'末端がCy5で修飾された500bpのDNA断片を用意した。このDNA断片試料をハイブリダイゼーション用溶液（4×SSCと10重量%のSDS水溶液との混合溶液）20μLに分散した分散液を、90℃で3分間加熱、冷却した後、前記スポット装置を用いて上記のDNAマイクロアレイ（B'）に点着した。表面を顕微鏡用カバーガラスで保護した後、モイスチャーチャンバー内にて60℃で、20時間インキュベートした。次いで、DNA分析用マイクロアレイを、室温の0.1重量%SDS水溶液と2×SSCとの混合溶液で2回、50℃の0.2×SSCで1回、および室温の蒸留水で1回順次洗浄した。次に、DNAマイクロアレイを600rpmで20秒間遠心して水分を除いた後、室温で乾燥した。

【0075】

## (4) 核酸断片試料の検出およびスポット再現性の評価

得られた各DNA分析用マイクロアレイについて、スポット部分の蛍光強度を前記蛍光スキャニング装置で測定し、標識したDNA断片試料を検出した。各スポットの蛍光強度（相対値）の平均値を求めた。また、スポットの蛍光強度（相対値）の変動係数CV（%）（N=50）を求め、これによりスポット再現性の評価を行った。

【0076】

[比較例5、6]

実施例 7 において、水溶性増粘剤を溶解した水溶液の代わりに、 $2\times\text{SSC}$  および蒸留水それぞれを用いて DNA 断片の分散した水性液を調製したこと以外は実施例 7 と同様にして、DNA 断片が固定された固相担体（DNA マイクロアレイ）を作製し、次いで、核酸断片試料の検出およびスポット再現性の評価を行った。

得られた結果をまとめて表 3 に示す。

【 0 0 7 7 】

【表 3】

表 3

増粘剤溶液	オリゴDNA(+)固定		cDNA(+)固定		ネガティブコントロール
	蛍光強度	CV(%)	蛍光強度	CV(%)	蛍光強度
実施例 7 1 重量%カルボキシメチル セルロース水溶液	18600	2.5	24600	2.4	0
実施例 8 1 重量%ポリアクリル アミド水溶液	20200	2.7	26600	2.1	0
実施例 9 30 重量%トレハロース 水溶液	16700	3.5	23100	3.2	0
比較例 5 2×SSC	15500	8.2	22200	9.2	0
比較例 6 蒸留水	15600	7.9	20300	8.6	0

【0078】



表 3 に示した結果から明らかなように、本発明の方法に従って水溶性高分子物質や糖類を含有する DNA 断片の水性液を用いて作製した DNA マイクロアレイ（実施例 7～9）は、従来の方法に従って作製した DNA マイクロアレイ（比較例 5、6）に比べて、オリゴ DNA を固定した場合、c DNA を固定した場合のいずれにおいても、蛍光強度が高く、かつスポットの CV が  $1/3 \sim 1/2$  に著しく減少した。これにより、本発明の方法では、点着が安定に行われ、スポット形状が円形に揃っていて良好であり、スポットの再現性が高いことが分る。その結果として、本発明の方法で製造した DNA 分析用マイクロアレイによれば、DNA 断片試料をより高い精度で検出できることが明らかである。

## 【 0 0 7 9 】

また、蛍光強度は水溶性増粘剤の種類によって大きな差はなく、ネガティブコントロールの蛍光強度も 0 であった。このことから、増粘剤の水溶性高分子物質や糖類は、いずれも洗浄により除去されて、DNA 断片の固相担体への固定には実質的に関与していないとともに、ハリブリダイゼーションを阻害してその効率を低下させることがないこと、および試料の検出に悪影響を及ぼさないことが分る。

## 【 0 0 8 0 】

## 〔比較例 7～9〕

実施例 7 において（2）の固相担体の洗浄、すなわち固相担体を沸騰水に 3 分間浸漬する処理を行わなかったこと以外は実施例 7 と同様にして、DNA 断片が固定された固相担体（DNA 分析用マイクロアレイ）を作製し、次いで、DNA 断片試料の検出およびスポット再現性の評価を行った。

得られた結果を、実施例 7～9 の結果とともにまとめて表 4 に示す。

## 【 0 0 8 1 】

【表 4】

表 4

	増粘剤溶液	オリゴDNA(+)固定		ネガティブコントロール	
		蛍光強度	CV(%)	蛍光強度	蛍光強度
実施例 7	沸騰水処理有り 1 重量%カルボキシメチル セルロース水溶液	18600	2.5	0	0
実施例 8	沸騰水処理有り 1 重量%ポリアクリル アミド水溶液	20200	2.7	0	0
実施例 9	沸騰水処理有り 30 重量%トレハロース 水溶液	16700	3.5	0	0
比較例 7	沸騰水処理無し 1 重量%カルボキシメチル セルロース水溶液	10300	6.6	300	300
比較例 8	沸騰水処理無し 1 重量%ポリアクリル アミド水溶液	13500	5.3	100	100
比較例 9	沸騰水処理無し 30 重量%トレハロース 水溶液	15800	3.8	0	0

【0082】

表 4 に示した結果から明らかなように、本発明の方法に従って固相担体を洗浄して水溶性増粘剤を除去した場合（実施例 7 ～ 9）にはいずれも、固相担体を洗浄しないで増粘剤の除去を行わなかった場合（比較例 7 ～ 9）に比べて、蛍光強度が高く、スポットの再現性も良好である。特に、増粘剤が水溶性高分子物質であるとき、蛍光強度が顕著に高く、スポットの再現性も極めて良く、より高い精度で試料を検出することができる。

#### 【 0 0 8 3 】

一方、洗浄しなかった場合には、ネガティブコントロールのスポットでも蛍光が検出され（比較例 7、8）、高い精度での検出を妨げている。なお、ネガティブコントロールの蛍光強度が 0 とならなかったのは、水溶性高分子物質自体による蛍光と、標識した DNA 試料が水溶性高分子物質に非特異的に吸着したためと考えられる。

#### 【 0 0 8 4 】

##### 【発明の効果】

本発明の DNA 分析用のマイクロアレイの製造法で利用するプローブ分子の固定方法によれば、プローブ分子の水性液に除去可能な水溶性増粘剤を添加することにより、固相担体表面にこの水性液を点着した際にスポットを安定化させ、その形状や大きさを揃えてスポット再現性を顕著に改善することができる。増粘剤はプローブ分子の固定後には実質的に除去されるので、ハイブリダイゼーションの際にプローブと DNA 断片試料との接触を妨げることがなく、ハイブリダイゼーションの効率が低下しない。同時に、バックグラウンドの蛍光強度を大幅に元首させることができる。従って、本発明の方法で製造された DNA 分析用マイクロアレイを用いることにより、総合的に、DNA 断片試料の検出精度を顕著に高めることができる。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

DNA マイクロアレイ技術の全体像の模式図である。

##### 【図 2】

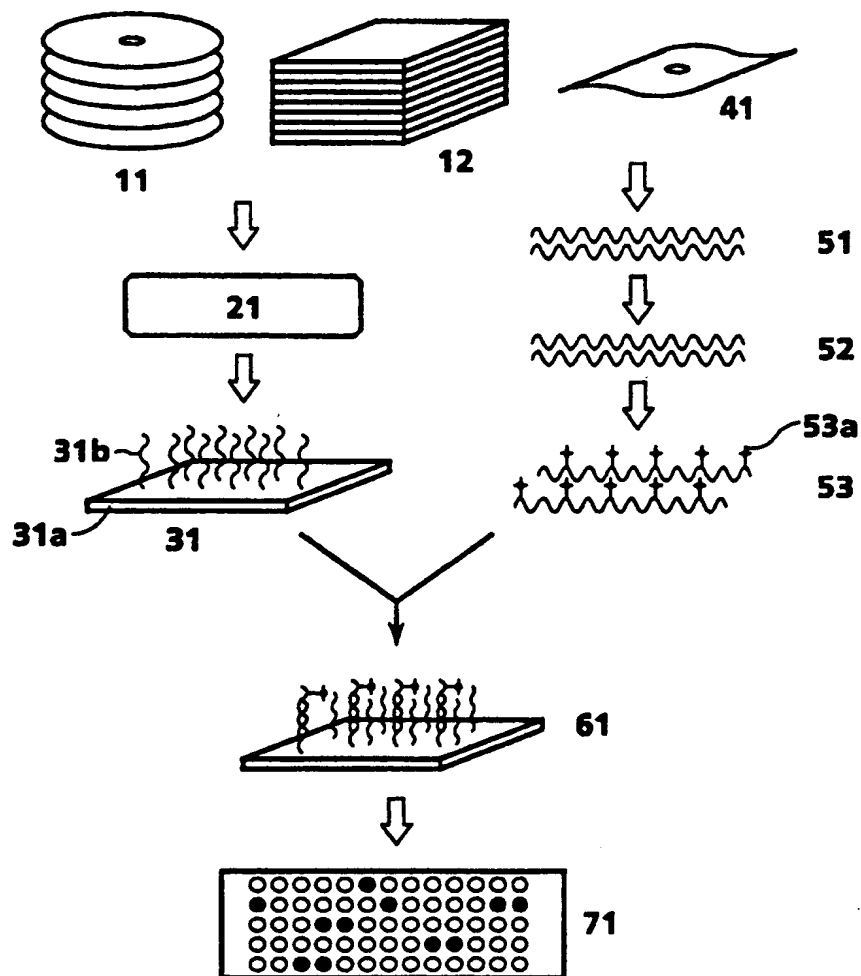
ハイブリダイゼーション後の DNA マイクロアレイの拡大模式図である。

【符号の説明】

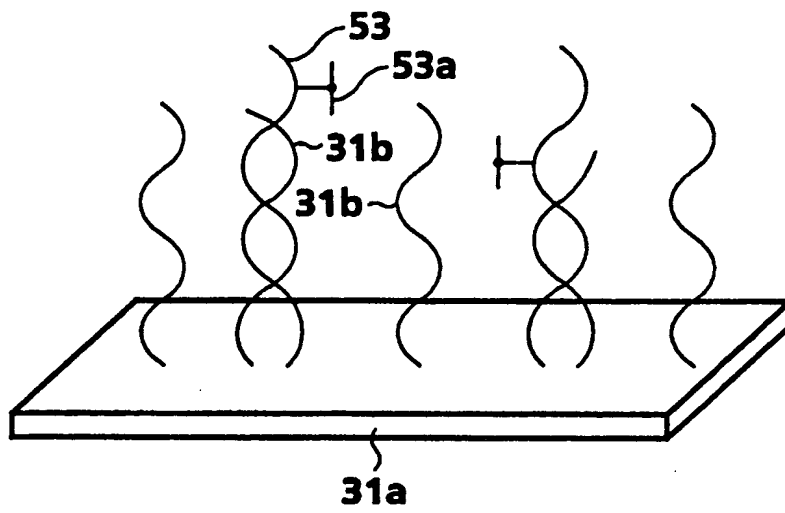
- 1 1 データベース
- 1 2 クローンコレクション
- 2 1 DNAコレクション
- 3 1 DNAマイクロアレイ
  - 3 1 a 固相担体
  - 3 1 b DNA断片
- 4 1 検体
- 5 1 mRNA又はゲノムDNA
- 5 2 cDNA又はターゲットDNA
- 5 3 標識したターゲット核酸
  - 5 3 a 標識物質
- 6 1 ハイブリッドDNAが形成されたDNAマイクロアレイ
- 7 1 画像データ

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DNAマイクロアレイを用いるDNA断片試料の検出において検出精度が高く、かつ検出誤差が少ないDNAマイクロアレイの製法を提供する。

【解決手段】 表面に反応性基を有する固相担体の上に、該反応性基と反応して共有結合を形成することのできる反応性基を備えた、核酸断片などのプローブ分子を含み、かつ増粘剤の添加により所定の粘度にまで増粘された水性液を点着する工程；該水性液の点着が行なわれた固相担体をインキュベートして、該基板表面にて共有結合反応を生起させる工程；そして、該基板表面を水性媒体で水洗して、増粘剤を固相担体表面から除去する工程を含むDNA分析用マイクロアレイの製法。なお、この増粘剤を用いるDNA分析用マイクロアレイの製法は、プローブ分子が固相担体表面に静電結合で固定される場合でも有効である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005201]

1. 変更年月日 1990年 8月14日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 神奈川県南足柄市中沼210番地  
氏 名 富士写真フイルム株式会社